

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg

HISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM
SUCCINODEHYDRASEGEGHALT DER NEBENNIERE.

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

verfasst und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Maria-Elisabeth Gulden
aus Tauberbischofsheim / Nordbaden

Würzburg 1959

STANFORD-LANE MEDICAL LIBRARY

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg

HISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM
SUCCINODEHYDRASEGEGHALT DER NEBENNIERE.

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

verfasst und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Maria-Elisabeth Gulden
aus Tauberbischofsheim / Nordbaden

Würzburg 1959

R e f e r e n t: Privatdozent Dr.med. G. D h o m

C o r r e f e r e n t: Professor Dr. F. T u r b a

Tag der Promotion: **5. 2. 59**

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

MEINEN ELTERN GEWIDMET.

Inhaltsübersicht.

I.	Einleitung	Seite 1
II.	Die Enzyme in der Nebenniere	" 1
III.	Fermente und Steroidogenese	" 4
IV.	Allgemeine Zellfunktion der Succinodehydrase	" 9
V.	Succinodehydrase und Steroidogenese	" 12
VI.	Biochemischer Nachweis der Bernsteinsäuredehydrase im adrenalen Gewebe	" 18
VII.	Histochemische Darstellbarkeit der S.D. in der Nebenniere	
	a) Eigene Versuche	
	1. Material und Methodik	" 22
	2. Tierversuche.	" 24
	3. Menschliche NN	" 25
	4. Eigenes Ergebnis	" 27
	b) Ergebnisse anderer Autoren	" 29
VIII.	Diskussion	" 32
IX.	Succinodehydrase und Stress	" 33
X.	Zusammenfassung	" 39

Literaturverzeichnis

I. Einleitung:

Die Entdeckung der Cortison- und ACTH-Wirksamkeit bei Leiden des allergisch-hyperergischen Formenkreises durch HENCH, KENDALL, SLOCUMB und POLLEY 1949 war nicht nur für die gesamte klinische Medizin von entscheidender Bedeutung, sondern regte darüber hinaus auch andere Forschungsgebiete, wie Steroidchemie, Mikrobiologie, die Forschungen über Nebennierenphysiologie, Biosynthese und hormonale Wirkung der Corticosteroide weiter an. So wurden jetzt direkte und indirekte Methoden zur Klärung der Steroidogenese entwickelt, wie Organextraktion, chemische Analyse der Urinsteroide an Mensch und Tier, Hormonsubstitution bei adrenaler Hypo- und Hyperfunktion, Analyse des Nebennierenvenenblutes, Perfusion und Untersuchungen an Schnitten und Homogenaten (vgl. Phys. Rev. 34, S. 459 ff).

II. Die Enzyme der Nebenniere.

Im Laufe dieser Entwicklung wurde auch die Enzymaktivität der Nebenniere einer eingehenderen Betrachtung unterzogen. Wohl waren vorher schon eine ganze Reihe von Fermenten nachgewiesen worden. So hatten BRADLEY und BELFER in einer Diskussion über die postmortale Autolyse der Nebenniere bereits auf den K a t h e p s i n g e h a l t der Nebenniere aufmerksam gemacht. Nach ihren Angaben entspricht dieser sowie die f e r m e n t - bedingte Autolyse der Nebenniere sehr weitgehend dem der Leber; der auffallend rasche Struk-

turverlust der Nebennierenzellen post mortem erschien den genannten Autoren daher nicht enzymabhängig, sondern soll nach ihren Angaben nur eine Fortsetzung der normalen Cytolyse der Rindenzellen darstellen, die schon während des Lebens abläuft und mit der sekretorischen Tätigkeit in Zusammenhang steht. Über den Lipasegehalt der Nebenniere hatten SCOZ und MARIANI eine Arbeit veröffentlicht, wo die lipolytischen Eigenschaften von Rinde und Mark untersucht und titrimetrisch bestimmt wurden. Zum Vorkommen der Atropinesterase in tierischen Organen u.a. auch in der Rattennebenniere nahmen GLICK und GLAUBACH Stellung, die das Ferment auf biochemischem Weg nur bei einem Viertel der untersuchten Tiere überhaupt nachweisen konnten, die höchsten Werte im Serum, danach in Leber, Verdauungstrakt und Herzmuskel sahen und für Niere und Nebenniere annähernd gleiche minimale Aktivitäten fanden. Durch HUSZAK wurde der spektroskopische Nachweis der Cytochromoxydase und des Cytochromsystems in der Nebenniere erbracht und auf das Fehlen der Cytochromoxydase im Mark aufmerksam gemacht. Danach wurde ein unterschiedlicher Oxydationsmechanismus in Rinde und Mark angenommen. Zur Bestimmung des Gehalts an alkalischer Phosphatase führte ELFTMAN systematische Untersuchungen an normalen jungen und erwachsenen Mäusen durch, die in dem Ergebnis resultierten, dass das Auftreten dieses Ferments mehr oder weniger geschlechtsspezifisch und

als Androgenwirkung aufzufassen ist. Die angewandte Technik nach Gomori führte nur bei erwachsenen männlichen Tieren zu einer histochemischen Manifestation der Fermentaktivität in Fasciculata und Reticularis, die bei Kastraten, jungen und weiblichen Individuen ausblieb. Bezüglich der Cholinesterase finden sich die ersten Angaben bei LANGE-MANN mit dem Ergebnis, dass das Nebennierenmark beim Menschen weit mehr Aktivität besitzt als die Rinde, was seine Erklärung in dem grossen Gehalt des Marks an präganglionären Nervenfasern des cholinergischen Typs findet, durch deren Reizung Acetylcholin in Freiheit gesetzt und die Produktion von Adrenalin ausgelöst wird. Jedoch fanden sich bei den einzelnen Tierarten Unterschiede bezüglich der Fermentkonzentration.

Über den Succinodehydrasegehalt der Nebenniere erfolgten Mitteilungen durch Mc SHAN, ERWAY und MEYER, die auf biochemischem Weg die Aktivität endokriner Organe systematisch untersuchten und die O_2 -Aufnahme pro mg Trockengewicht und Stunde als Vergleichsmass ihren Bestimmungen zugrunde legten. Dabei zeigte Lebergewebe eine weit grössere Aktivität als jegliches endokrine Organ, doch waren unter letzteren die Nebenniere und Luteingewebe eindeutig führend. Unter der Annahme, dass Hormone und Fermente sich wechselseitig beeinflussen, wurde von den genannten Autoren auf die hohe Succinodehydraseaktivität dieser beiden anatomisch und funktionell ausserordentlich ähnlichen

Gewebe besonders hingewiesen und ein Zusammenhang des Succinodehydrasegehalts mit der Steroidogenese bereits angedeutet.

Auch die Abhängigkeit der Succinodehydraseaktivität von physiologischen Bedingungen wurde anhand des unterschiedlichen O_2 -Verbrauchs in Ovarialgewebe gravider und nicht gravider Ratten erörtert.

III. Fermente und Steroidogenese.

Diese funktionelle Betrachtungsweise trat nun gegenüber der früheren mehr deskriptiven in der Folgezeit immer mehr in den Vordergrund und wurde durch die gleichzeitige Weiterentwicklung der biochemischen Forschung über Steroidogenese und Steroidchemie befruchtet. Namentlich mit der Methode der Perfusion suchte man zu eruieren, welche Fermente bei der Entstehung einzelner Steroide in Wirkung treten und welcher Aktivatoren sie in vitro bedürfen.

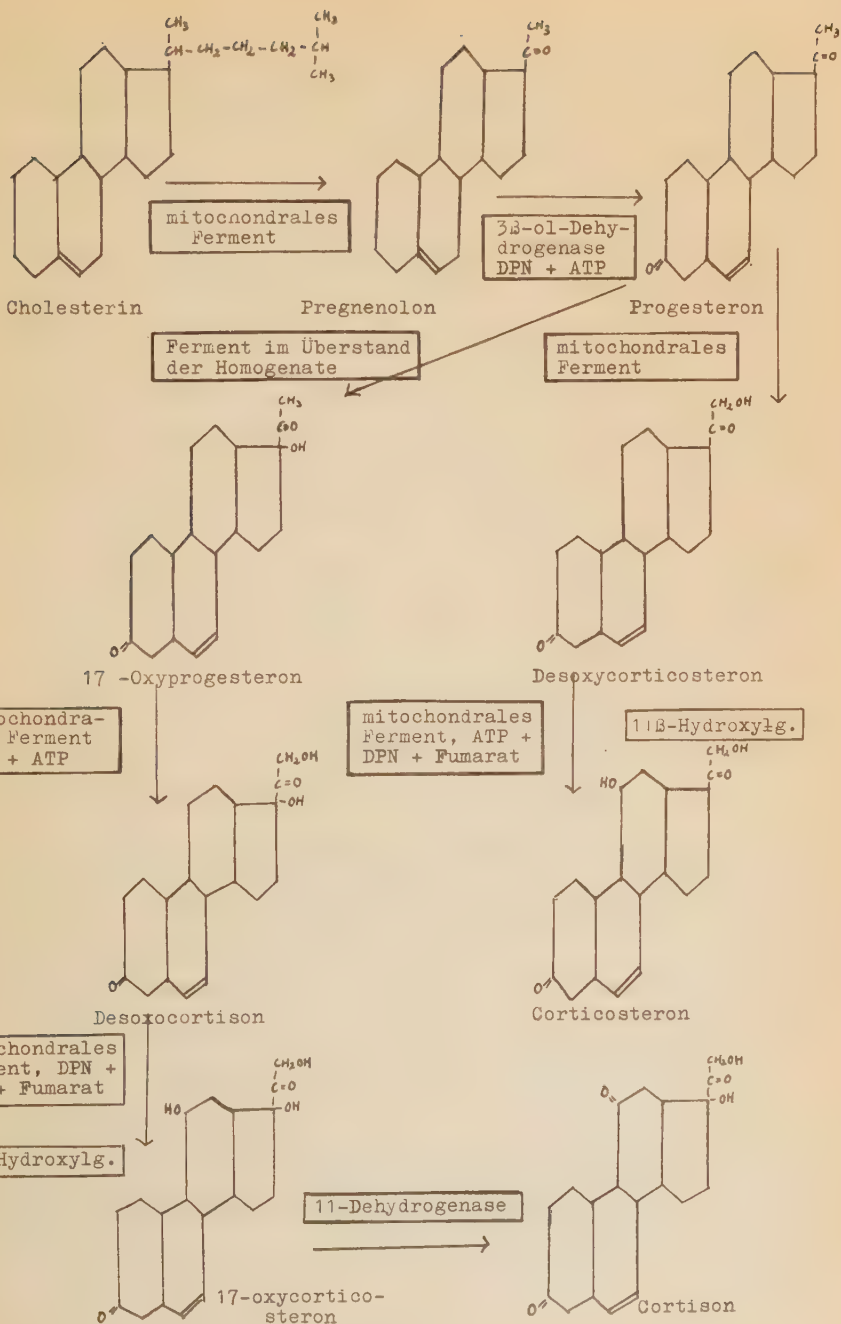
In diesem Zusammenhang möchten wir einen kurzen Überblick von den derzeitigen Anschauungen über die Biosynthese der Corticosteroide, sowie die an diesen Vorgängen beteiligten mehr oder weniger bekannten Enzyme geben, der jedoch den Rahmen dieser Arbeit nicht sprengen soll und daher auf Vollständigkeit bewusst verzichtet.

Durch die Perfusionsversuche an Nebennierengewebe von ZAFFARONI, HECHTER und PINCUS wurde zuerst auf das C h o l e -

sterin als möglicher Muttersubstanz der Corticosteroide hingewiesen, was in weiteren Arbeiten (HECHTER und PINCUS) noch eingehender dargelegt wurde. Allerdings können aktive Hormone auch direkt aus Acetat, Acetoacetat und niederen Fettsäuren aufgebaut werden, wie bei der Perfusion von Rindernebennieren mit C_{14} -Acetat festgestellt wurde (HECHTER, SOLOMON, ZAFFARONI und PINCUS). Dass andererseits in der Nebennierenrinde Acetat in Cholesterin umgewandelt wird, war bereits durch SRERE, CHAIKOFF und DAUBEN gezeigt worden. Eine eindeutige Stellungnahme dazu, ob nun das Cholesterin beim Steroidaufbau nur im Nebenschluss liegt oder eine zwangsläufige Zwischenstufe darstellt, erfolgte bisher noch nicht. Von einigen Autoren wird die Möglichkeit erwogen, dass dieses Substrat ähnlich dem Jod der Schilddrüse als leicht verfügbarer Speicherstoff fungiert, auf den der Organismus im Bedarfsfall zurückgreifen kann und der sich durch die Ausschüttung von ACTH rasch mobilisieren lässt (HECHTER 1951 und HECHTER, SOLOMON, ZAFFARONI und PINCUS 1953).

Vom Cholesterin führt der nächste Weg zum Pregnenolon (HECHTER und MITARB. 1951), das selbst noch inaktiv, möglicherweise eine zentrale Stellung im Aufbau der Corticosteroide einnimmt, "da aus ihm theoretisch als auch experimentell alle aus der Nebenniere bzw. ihren Sekretionsprodukten isolierten C_{21} -Steroide abgeleitet werden können" (vgl. Hdb. phys.Chem. FLASCHENTRAGER-LEHNARTZ II S.883). Das dabei wirksame Ferment ist nach HECHTER und PINCUS (1954) in den

Mitochondrien der Rindenzellen lokalisiert. Die Umwandlung des Pregnenolon zum Progesteron bedarf einer 3β -Hydroxy-Dehydrogenase - der Name bezeichnet die stereische Spezifität des Ferments, da es nur auf eine OH-Gruppe in β -Stellung an C_3 wirksam ist - , die sich durch DPN (Diphosphopyridinnukleotid) und ATP (Adenosintriphosphosäure) aktivieren lässt, in Rindenzellen viel höher konzentriert ist als im Mark, daneben auch im Corpus luteum, Placentargewebe und in hormonaktiven Tumoren sowie in Hodenzwischenzellen nachgewiesen wurde (SAMUELS 1955). Neuerdings wurde durch LANMAN und MOSHEL das Vorkommen dieses Ferments in der Nebenniere menschlicher Neugeborener in Frage gestellt und eine eventuelle Lieferung des Progesteron durch die Placenta erörtert. Die am Progesteron einsetzenden Oxydationen und Dehydrierungen, die nicht mehr unter dem Einfluss von ACTH stehen (HECHTER 1951; HAYANO und DORFMAN 1954), verlaufen nach HECHTER und PINCUS 1954 in einer ganz bestimmten Reihenfolge, indem zunächst an C_{17} eine Hydroxylgruppe eingeführt wird. Dabei entsteht das 17-Oxyprogesteron durch Einwirkung eines im Überstand der Nebennierenhomogenate befindlichen besonders labilen Ferments mit den Cofaktoren DPN und ATP oder TPN (PLAGER und SAMUELS 1953). Danach kann die Hydroxylierung an C_{21} einsetzen, die durch ein System mitochondrialer Lokalisation wiederum mit DPN und ATP



als Cofaktoren bewirkt wird (PLAGER und SAMUELS 1954). So entsteht das Desoxocortison und aus dem Progesteron direkt das Desoxycorticosteron. Daraus leiten sich durch die Vorgänge der 11 β -Hydroxylierung mit einem mitochondrialen durch ATP und DPN oder TPN aktivierbaren Enzym (SWEAT 1951; HAYANO und DORFMAN 1951) die peripher so wirksamen Verbindungen wie das 17-Oxycorticosteron (Compound F) und das Corticosteron ab. Gerade diese Gesetzmässigkeit im Ablauf der Oxydationen gab Anlass zu profunder Enzymforschung, da man vermutete, dass ihr eine besondere Spezifität der beteiligten Fermente zugrunde liegt. Die 11 β -hydroxylierten Verbindungen werden von Nebennierenhomogenaten nicht weiter oxydiert, offenbar aus dem Grunde, dass das 11 β -Hydroxyl von den Nebennierenfermenten als "Erkennungsmarke eines Endprodukts" betrachtet wird (HECHTER u. PINCUS 1954). Diesen Substituenten tragen sowohl das Corticosteron wie das Hydrocortison, also jene Verbindungen, die nach Angaben von HECHTER und PINCUS 1954 bei der Perfusion von tierischen Nebennieren nach Zusatz von ACTH 63% des gewonnenen Steroidextrakts ausmachen, bei allen Tierarten auftreten und folglich als "Haupt hormone" betrachtet werden. Damit ist jedoch weder über ihre eventuelle physiologische Dominanz etwas ausgesagt, noch über die physiologische Bedeutung der Spurenhormone, da unter physiologischem Aspekt nicht nur die Konzentration des einzelnen Hormons, sondern auch seine biologische Aktivität eine Rolle spielen. Das Spektrum der Spurenhormone weist einerseits

ganz beachtliche Artunterschiede auf, andererseits lässt es aber auch individuelle Variationen erkennen, was auf Differenzen in der Enzymaktivität der Nebenniere bezogen wird (HECHTER und PINCUS 1954). Wohl für den Abbau der Rindenhormone eine Rolle spielen die bei DORFMAN und UNGAR (1953) unter den übrigen Fermenten aufgezählten Systeme der 3β -Hydrogenase, welche Progesteron zu Allopregnan- 3β ,17-diol,20-on überführt, der Δ_4 -5-Hydrogenase, welche Δ_4 -Androsten-3,17-dion zu Androstan-11 β -ol,3,17-dion verwandelt, sowie der 20-Carboxydesmolase, die Doc (Desoxycorticosteron) zu Δ_4 -Ätiocholansäure abbaut. Ob das in Perfusionsversuchen durch ATP und DPN aktivierbare System 6 β -Hydroxylase auch in vivo wirksam ist, bleibt noch unklar (HAYANO, WIENER u. LINDBERG 1953). Zu erwähnen ist ferner noch eine 3β -Dehydrogenase, auf die MEYER, JEANLOZ u. PINCUS bei der Umwandlung von Dehydroepiandrosteron zu Δ_4 -Androsten-11 β -ol,3,17-dion aufmerksam machten.

IV. Allgemeine Zellfunktion der Succinodehydrase.

Was nun die spezifische Aufgabe der Succinodehydrase für die Nebenniere und Steroidogenese betrifft, so ergeben sich einige diesbezügliche Anhaltspunkte in der uns zugänglichen Literatur biochemischer Forschung. Bevor wir aber näher darauf eingehen, möchten wir kurz die Funktion des Ferments in der Zelle schlechthin erörtern.

Seit Thunberg 1917 die Dehydrierung der Bernsteinsäure zu Fumarsäure durch die im Muskelgewebe enthaltene Succinodehydra-

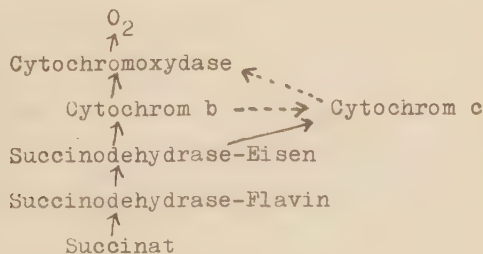
se entdeckt und Szent Györgi 1937 dem Substrat dieses ausserordentlich wirksamen Ferments, der Bernsteinsäure, die Rolle des "hydrogen carrier" bei der biologischen Oxydation zuerkannt hat, ist über die Isolation, Eigenschaften und chemische Struktur der Succinodenhydrase eine umfangreiche Literatur entstanden. Bezüglich der uns in diesem Zusammenhang interessierenden Daten kann man die Ergebnisse dieser vielseitigen Erörterungen etwa folgendermassen zusammenfassen:

aus dem in fast allen tierischen Zellen in hoher Konzentration vorkommenden Fermentkomplex konnte in den letzten Jahren durch Zellzentrifugation und anschliessender Extraktion der Mitochondrienfraktion (BASFORD, TISDALE u. GREEN 1957) ein löslicher Anteil isoliert werden, der neben Nicht-Häm-eisen eine Hämkomponente und an Protein gekoppeltes Flavin enthält; als prosthetische Gruppe nahm man FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid) an (SINGER, KEARNEY, MASSEY 1955). 1956 gelang durch Verfeinerung der Gewinnungstechnik und Verwendung etwas gealterter Mitochondrienpräparationen die Reindarstellung des Enzyms (SINGER, KEARNEY u. BERNATH); danach handelt es sich um ein lösliches Ferroflavoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 220 000, das pro 100.000g Protein 1 Grammatom Eisen enthält. Pro Mol Protein soll es 1 Mol Flavin und 4 Grammatoeme Eisen enthalten. Bei 35° ist das Wirkungsoptimum bei pH 7,7 gelegen. Unter physiologischem Aspekt stellt das Ferment ein Glied der biologischen Oxydationskette dar, in deren Ablauf durch mehr oder weniger bekannte enzymatische Potenzen der im Blut- und Lymphstrom

an die Zelle herangebrachte Sauerstoff durch Elektronenaufnahme aktiviert wird und sich mit dem bereits durch andere Fermente aktivierten Wasserstoff zu Wasser verbindet. Die Reaktion der beiden Elemente Sauerstoff und Wasserstoff verläuft also nicht spontan und unmittelbar, sondern erfolgt in Etappen. Bekanntlich dient dieser Verzögerungseffekt, der im Elektronentransport über bekannte und nicht bekannte Zwischenstufen gegeben ist, dem Zwecke der Energiegewinnung und -speicherung für Basal- und Leistungsstoffwechsel der Zelle.

Denn eine unmittelbare Reaktion beider Elemente miteinander hatte auch die prompte Freigabe der Energie zur Folge, die dann als Wärmeenergie abgestrahlt wurde und somit dem Energiefond der Zelle verloren ginge (LEHNARTZ 1949). Bei diesen Vorgängen spielt wohl das in der Succinodehydrase enthaltene Eisen die Rolle des Elektronentransporteurs vom Flavin auf Cytochrom c bzw. b, während das Flavin mit Succinat korrespondiert (WAGENKNECHT u. RAPOPORT 1956).

Die Einordnung der Succinodehydrase in die Atmungskette geht aus folgendem von RAPOPORT und NIERADT als vorläufig angegebenen Schema hervor, das wir für unsere Zwecke in etwas verkürzter Form wiedergeben möchten:



Wie alle Fermente der Atmungskette ist die Succinodehydrase nicht im Zellkern, sondern in den Mitochondrien des Plasmas lokalisiert (SHEPHERD und KALNITZKY 1951).

So wurden mit der Methode der Zellzentrifugation an Leberzellhomogenaten und anschliessender Fermentbestimmung der einzelnen Fraktionen die Verteilung der Succinodehydrase im überstehenden Rest mit 11%, in der Kernfraktion mit 7%, in den Mitochondrien mit 75% angegeben (NEUMANN u. KOCH 1953).

V. Succinodehydrase und Steroidogenese.

Nach diesen Ergebnissen steht zu erwarten, dass die Succinodehydrase als Glied der Oxydationskette zu den enzymatischen Bestandteilen jeder Zelle und jeglicher Gewebsart gehört, doch bleibt die Frage nach ihrer quantitativen Verteilung in den einzelnen Organen interessant. Nach den Untersuchungen von FELIX, DECKER u. ROKA zeigen die Mitochondrien der einzelnen Organe ein für sie spezifisches Fermentspektrum, das unter den Individuen der gleichen Tierart konstant bleibt, hingegen von Tierart zu Tierart in seiner Zusammensetzung wechselt. Obwohl nun die Succinodehydrase ein für die Mitochondrien spezifisches Ferment ist, so bewegt sich ihre Konzentration in den Mitochondrien verschiedener Organe in grossen Amplituden. Bzgl. der Nebenniere wird von diesen Autoren neben anderen Dehydrasen ein höher

Succinodehydrasegehalt angegeben. Die Succinodehydraseaktivität der Nebennierenmitochondrien soll die der Leber um ein Drittel übertreffen, wobei allerdings zu berücksichtigen bleibt, dass in diesen Versuchen auch die Potenzen von Bindegewebe und Blut der einzelnen Organe miterfasst wurden, da die Organe nicht gespült wurden. Bei den systematischen histochemischen Untersuchungen von NEUMANN u. KOCH, auf die wir weiter unten noch genauer eingehen, stellten sich im Versuch an Hund und Meerschweinchen Herz, quergestreifte Muskulatur, Belegzellen des Magens als aktivste Gewebe heraus, dann folgten die Streifenstücke seröser Drüsen, Oberflächenepithelien in Drüsen des Darmes, einzelne Nephronanteile, die Pyramidenzellen des Gehirns und die peripheren Anteile der Leberlappchen. Unter den endokrinen Organen allerdings lässt sich auch hier der grösste Succinodehydrasegehalt in der Nebenniere nachweisen. JARDETZKY u. GLICK stellten unter Verwendung eines quantitativen Nachweises mit Neotetrazol an Rattennebenieren fest, dass die Aktivität der Reticularis allein in gleicher Grössenordnung mit der Leber lag. In diesen Rahmen fügen sich auch die Befunde von Mc SHAN, ERWAY u. MEYER, dass die bei verschiedenen Organhomogenaten nach Zusatz von Succinat als spezifischem Substrat aus der O_2 -Aufnahme abgeleitete Succinodehydraseaktivität in menschlicher Leber fünfmal höher als

in menschlicher Nebenniere, bei dieser aber sowie im Lutein-
gewebe bedeutend höher als in allen übrigen
endokrinen Organen lag. Dass die ge-
nannten Autoren diese Auffälligkeit irgendwie mit der Ste-
roidogenese erklärt wissen wollten, wurde bereits erwähnt.
Auch ZWEIFACH, BLACK u. SHORR reihten aufgrund ihrer histo-
chemischen Untersuchungen die Nebenniere unter die
bernsteinsäuredehydrogenaseaktivsten
Gewebe ein, wiesen jedoch auf die Parallelität
zwischen jeweiligen Funktions-
zustand und Fermentaktivität hin.
Auf diese interessanten Befunde wird in der Diskussion noch
weiter eingegangen.

In diesem Zusammenhang können nun die Erörterungen von NEU-
MANN u. KOCH aufschlussreich sein, nach denen man in fer-
mentreichem Gewebe ausser dem allen lebenden Zel-
len eigenen Grundstoffwechsel einen zusätzlichen an eine be-
stimmte Aufgabe geknüpften Spezialstoffwech-
sel annehmen muss. Biologische Zellfunktionen sind durch
die in den Zellen vorhandenen Enzyme garantiert, deren bio-
chemischer oder histochemischer Nachweis umgekehrt - wenig-
stens bedingt - Rückschlüsse auf die Aufgaben der untersuch-
ten Zellen erlaubt.

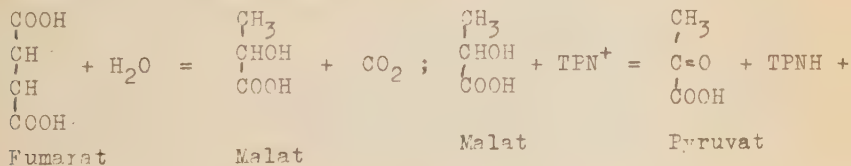
Es erhebt sich nun die Frage, ob aus den bisherigen physiolo-
gisch-chemischen Forschungen eine solche Beziehung des oben
angeführten relativen Succinodehydrogenasereichtums der Neben-
nierenzellen und ihrer spezifischen Funktion d.h. der Stero-
idogenese und Bildung von Adrenalin zu eruieren ist, mit an-

deren Worten, ob die Bernsteinsäuredehydrogenase bei irgendeiner Stufe des komplizierten Aufbaus des Steroidmoleküls eine spezifische Rolle spielt. Von vorn herein sei gesagt, dass das Nebennierenmark an dem genannten Fermentreichtum keinen Anteil trägt; es bleibt, wie weiter unten noch ausgeführt wird, bei den bisher durchgeführten histochemischen Nachweisverfahren praktisch leer, obwohl bei der Adrenalinbildung der Citronensäurecyclus sicher eingeschaltet ist.

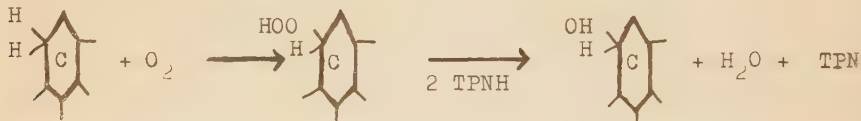
Demgegenüber finden sich einige Angaben in der eingesehenen Literatur, die zumindest indirekt auf die Beteiligung der Succinodehydrogenase bei der Biosynthese der Corticoide hinweisen. So geben HOFMANN, KRAUSHAAR-BALDAUF u. STAUDINGER 1952 an, dass sie bei der Bebrütung frischer Schweinenebennieren auf Fumaratzusatz einen erheblichen Anstieg der papierchromatographisch bestimmten Hormonproduktion erzielten. Die Wirkung der Fumarsäure erschien ihnen spezifisch, da eine ledigliche Veränderung des pH durch Zusatz anderer Säuren ohne Effekt blieb, und biologisch, da die Wirkung mit dem Alter der Drüse rasch nachliess und ausserdem nur bei einem bestimmten Konzentrationsoptimum erfolgte. Mit der Warburgapparatur wurde gleichzeitig ein deutlicher Mehrverbrauch an O_2 gemessen, sodass die genannten Autoren eine durch Fumarat gesteigerte Energieproduktion als Ursache des Effekts ansahen. In einer weiteren Arbeit gingen SCHMIDT u. STAUDINGER 1954 noch einmal näher auf diese Vorgänge ein; sie gaben dabei die Wirksamkeit auch der übrigen C_4 -Dicarbonsäuren, also Succinat, Oxalacetat und Malat an, die sie im Sinne Szent Györgis in

einer Beschleunigung des H_2 -Transports bei der biologischen Oxydation sahen. Dabei würde durch die Wirkung der Bernsteinsäuredehydrase aus Succinat dauernd Fumarat bereitgestellt, das den bei den zahlreichen im Verlauf der Steroidogenese erfolgenden Oxydationen freierwerdenden Wasserstoff im Rahmen der H_2 -Aktivierung aufnehmen könnte. Ferner wurde bei der $C_{11}\beta$ -Hydroxylierung, welche vom Doc zum Corticosteron und vom Doca zum Hydrocortison führt, ebenfalls eine spezifische und biologische Wirksamkeit der Fumarsäure festgestellt (KAHNT u. WETTSTEIN 1951). Dabei wurden schlachtfrische Nebennieren in der üblichen Lösung homogenisiert und nicht acetylierte Steroide eine bis vier-einhalb Stunden bei 37° mit O_2 bebrütet. Fumarat führte zu einer erheblichen Ausbeute und konnte in seiner Wirksamkeit nicht durch andere gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren ersetzt werden. Zum ähnlichen Ergebnis waren HAYANO, DOREMAN u. YAMADA 1951 gekommen, die die 11β -Hydroxylierung an Nebennierenhomogenaten beobachteten. Ihre Hypothese lautete derart, dass die Einführung des O-Atoms an C_{11} in Ring C über eine Hydratation und nachtragliche oxydydative Entfernung der 2 H-Atome erfolgen könnte. Die Energie dieses endergonen Prozesses wurde durch ATP geliefert, wobei Mg^{++} -Ionen und Fumarat stimulierend wirkten. Weitere Arbeiten (HAYANO u. DOREMAN 1953) scheinen die notwendige Anwesenheit der Fumarsäure bei der Bildung von Corticosteron zu bestätigen. Hatte man nämlich Homogenate vier bis sechs Wochen in der Kälte aufbewahrt, so verloren sie ihre Aktivität, die sie auf Zusatz von DPN und

ATP, sowie O_2 und Fumarat sofort wieder erlangten. Auch SWEAT 1951 wies auf die Notwendigkeit des Fumaratzusatzes hin. Später kamen HAYANO u. DORFMAN (1954) zu der Ansicht, dass die Dicarbonsäuren als H_2 -Überträger wirksam sind und schlossen eine direkte H_2O -Anlagerung an C_{11} aus. Vielmehr soll nach HAYANO, LINDBERG, DORFMAN, HANCOCK u. v. DOERING 1955 molekularer O_2 an C_{11} eingeführt werden. Entgegen diesen Anschauungen lehnen BROWNIE u. GRANT eine spezifische Funktion des Fumarats ab, sondern glauben, dass die in den Versuchen zugeführte Bernsteinsäure bzw. Fumarsäure in den Citronensaurecyklus eingehen und dabei Substrate für die mit der 11 β -Hydroxylierung gekoppelten oxydativen Reaktionen verschaffen. In einer weiteren Arbeit (1956) weisen diese Autoren darauf hin, dass Fumaratzusatz bei der 11 β -Hydroxylierung nur dann notwendig ist, wenn die Mitochondrien in hypotonen Medien aufgeschwemmt oder mit Aceton getrocknet wurden d.h. also wenn ihre Strukturen durch die Aufbereitungsverfahren zerstört wurden. Die Wirkung des Fumarat wird bei diesen Untersuchungen komplizierter gesehen: für die 11 β -Hydroxylierung ist TPNH, also das hydrierte Triphosphopyridinnukleotid notwendig. Damit dieser Cofaktor immer in der notwendigen Konzentration vorhanden ist, wird L-Malat zu Pyruvat dehydriert. - Das Fumarat sollte für die Entstehung von L-Malat verantwortlich sein:



So ist nach der Meinung der genannten Autoren nur TPNH und molekularer O_2 zu 11 β -Hydroxylierung erforderlich, wenn die Mitochondrienpräparation in der von ihnen angegebenen - schonenderen - Weise hergestellt wird. Sie vermuten, dass zunächst die Bildung von 11-Hydroperoxyden eintritt, die durch TPNH reduziert werden:



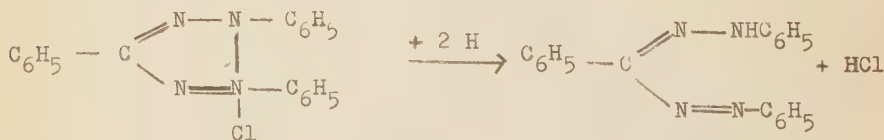
Besteht auch, wie ausgeführt, über die spezifische Funktion der Fumarsäure und damit des auf sie wirksamen Ferments, der Bernsteinsäuredehydrogenase, bei der Steroidogenese noch keine einheitliche Auffassung, so dürften die verschiedenen Anschauungen sich doch darin einigen, dass in einem so reaktionsfähigen und funktionell so vielseitig beanspruchten Organ wie der Nebenniere die Komponenten der biologischen Oxydationskette und damit auch die Succinodenhydrase in besonders reichem Mass vertreten sein müssen, zumindest eben in den Stadien gesteigerter Beanspruchung der inneren Sekretion. Zum zweiten ist nach unserer Ansicht anzunehmen, dass beim Aufbau des Steroidmolekuls - und darin liegt die spezifische Funktion für die Nebenniere - der ja über mehrere Oxydationsstufen verläuft, irgendwie das H_2 -aufnehmende Fumarat eingeschaltet ist und durch fortwährende Aktivität der Succinodenhydrase immer wieder zur Verfügung gestellt wird. Wie diese Reaktionen im einzelnen verlaufen, werden weitere physiologische Studien noch erarbeiten müssen.

VI. Biochemischer Nachweis der Succinodehydrase im adrenalen Gewebe. Unsere Fragestellung nach dem Succinodehydrasegehalt des adrenalen Gewebes richtet sich nun zunächst auf die biochemischen Nachweisverfahren, dann auf die histochemische Darstellbarkeit des Ferments sowohl in eigenen Versuchen wie in Experimenten anderer Autoren. Einige Befunde hatten wir bereits oben gestreift. Nach unserer Ansicht ist ein Vergleich der biochemischen Forschungsergebnisse mit den histochemischen Befunden sehr wertvoll, denn erst in der Kombination beider Untersuchungsmethoden kann über die quantitative und qualitative Verteilung des Ferments in der Nebenniere eine gültige Aussage gemacht werden. Bezieht sich der Vorteil der histochemischen Verfahren auf die Lokalisierung der Fermentaktivität - häufig erweisen sich nur bestimmte Zelltypen als aktiv oder vornehmlich aktiv -, so erlaubt die biochemische Darstellung demgegenüber genauere mathematische Rückschlüsse auf die Höhe der Fermentkonzentration.

Wenngleich in den biochemischen Verfahren von allen Autoren eine erhebliche Aktivität des Ferments in der Nebenniere angenommen wird, so sind die Einzelergebnisse keineswegs ganz einstimmig. Bei den bereits erwähnten Untersuchungen von Mc SHAN, ERWAY u. MEYER wird Nebennierengewebe homogenisiert in einem Medium, das Na-Succinat als spezifisches Substrat der Succinodehydrase enthält; die Fermentaktivität, gemessen an der O_2 -Aufnahme im mm^3 pro μg Trockengewebe und Stunde (Q_{O_2}), wird für die Leber mit 87,5, für die Nebenniere

mit 40,0 angegeben im Vergleich zu Hypophyse	mit 23,4
Thyreoidea	" 25,9
und Hoden	" 23,0.

Die Quotienten der übrigen Organe mit innere Sekretion liegen alle unter diesen Werten. Von den gleichen Autoren wird in einer weiteren Arbeit (1947) aufgezeigt, dass in Nebennieren jugendlicher Ratten der $Q O_2$ um 25% höher liegt als bei Erwachsenen. Ferner wurde bereits auf die Untersuchungen von FELIX, DECKER u. ROKA hingewiesen, nach welchen die Succinodehydaseaktivität der Nebenniere die der Leber um ein Drittel überwiegt. In diesen Versuchen wurden Homogenate aus Rindernebenieren verwendet und die Aktivität nach der Azetylenblaumethode von Thunberg bestimmt. PARRY u. SPRING (1952) bestimmten die Succinodehydaseaktivität an Nebennierenhomogenaten von zehn normalen Ratten, die sie in einem Incubationsmedium mit Na-Succinat und TTC (Triphenyltetrazoliumchlorid) bei 37° über eine Zeit von 60' unter anaeroben Bedingungen ließen. Dabei entstand ein Formazan (s. Formel), dessen optische Dichte spektrophotometrisch bestimmt wurde. Der Wert des reduzierten TTC pro 100mg Nebenniere belief sich auf 252 μ g.



2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
fahlgelb in wässriger Lösung

Formazan
blaues kristallines Pigment

In diesem Zusammenhang sind noch einige weitere Untersuchungen erwähnenswert, die sich alle auf bestimmte Probleme beziehen, so auf den Einfluss von Alter und Geschlecht auf die Succinodehydraseaktivität der Nebenniere (KALANT u. SELLERS 1954), die Wirkung der Sexualhormone (KALANT 1957) und den Testosteroneffekt auf dieselbe (KALANT 1958). Dabei wird mit Homogenaten aus Rattennebenniere gearbeitet, die in einem Medium mit Na-Succinat bebrütet werden; als Mass der Fermentkonzentration dient die O_2 -Aufnahme in ml pro mg Nebennierenstickstoff und Stunde. Bei KALANT u. SELLERS wurde der $Q\ O_2$ an dreissig vier bis fünf Wochen alten männlichen Tieren mit 256 bestimmt, an vierzehn fünf bis neunwöchigen mit 308, an sieben siebzehn bis neunzehn Wochen alten mit 265; die entsprechenden Werte bei weiblichen Individuen sinken von 212 über 169 auf 148. In der Arbeit von KALANT 1957 wird für zweiundzwanzig normale männliche Tiere im Alter von zehn bis elf Wochen ein $Q\ O_2$ mit 336 und für gleichaltrige Weibchen ein solcher von 162 angegeben. Versuche, die sich auf die Bestimmung des aktiven Succinoxidasekomplexes beim Stress durch Atmung in ionisierter Luft beziehen, wurden von NIELSON u. HARPER an Ratten unternommen. Die angewandte Technik entspricht der oben angeführten, nur wurde dem Medium kein Succinat beigelegt; der an Normaltieren in einer Periode minimaler Aktivität bestimmte $Q\ O_2$ betrug 175, in Zeiten maximaler Beanspruchung etwa 226! Waren die Tiere ionisierter Luft ausgesetzt, so kam es zum signifikanten Abfall der Aktivität; eine einmalige Dosis von ACTH (adrenocorticotropes Hormon)

führte zum geringen Anstieg, bei Wiederholung der Injektion nahm die Fermentkonzentration rapide ab.

Wenn auch, wie ersichtlich, die einzelnen Ergebnisse hinsichtlich ihrer mathematischen Grösse etwas differieren, so zeigen diese Versuche doch allgemeine Gesetzmässigkeiten auf, so z.B. dass in männlichen Nebennieren die Aktivität signifikant höher ist als in weiblichen, dass ferner eine Altersabhängigkeit und eine solche vom übrigen Hormonhaushalt besteht; daraus erhellt, dass auch die Angaben der Biochemie jeweils auf Faktoren wie Geschlecht, Alter, Tierart, hormonale Momentansituation und Umwelteinflüsse zu beziehen sind. Im folgenden soll erörtert werden, ob und in welcher Weise die Bernsteinsäuredehydrase auf histochemischem Weg in der Nebenniere fassbar ist. Wir möchten zunächst auf eigene Untersuchungen eingehen, um sie später mit den Ergebnissen anderer Autoren in Vergleich zu setzen.

VII. Histochemischer Nachweis der Succinodehydrase in der Nebenniere.

a) Eigene Versuche.

1. Material und Methodik. Der histochemische Nachweis der Succinodehydrase in Nebennierengewebe wurde an fünf Mäusen, acht Ratten, sechs Meerschweinchen, vier Kaninchen, vier Katzen und an einem Hund versucht. Ferner wurde die gleiche Methode erstmals an menschlicher Nebenniere angewandt, wobei sechs Neugeborene in kurzer Zeit d.h. 30' und 3 h p.m. zur

Sektion kamen, um die autolytischen Prozesse und die damit verbundene Inaktivierung einzelner Fermente möglichst zu beschränken. wir gingen nach dem von NEUMANN u. KOCH angegebenen Verfahren vor, indem 15 - 35 μ dicke Nativgefrierschnitte drei bis fünf Stunden in einem Medium folgender Zusammensetzung bei 37° bebrütet wurden:

1% ige Lösung von Tetrazolpurpur (Indikator, Formel s.unten)	5,0 ml
Na-Succinat 1% ig, ph 7,6 (spezifisches Substrat)	4,0 ml
0,1 molarer Phosphatpuffer ph 7,6	1,0 ml

Danach wurden die Schnitte für 30' in Formalinwasser gespült und in Glyceringelatine eingebettet.

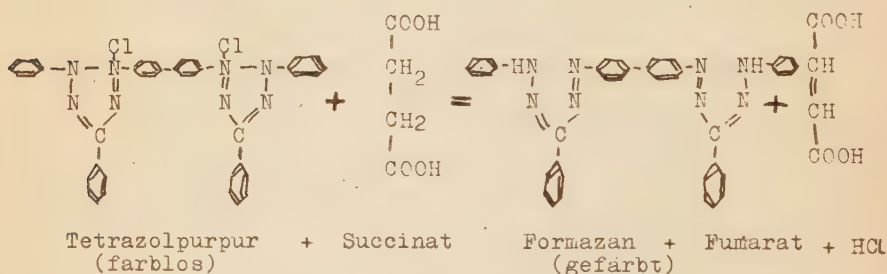
Die theoretischen Voraussetzungen der angewandten histochemischen Reaktion sind folgende:

1. Es werden möglichst dicke Gefrierschnitte gefertigt, da diese weniger zerstörtes Zellmaterial enthalten (PEARSON u. DEFENDI 1954).
2. Durch den Gefrierprozess werden nicht näher zu definierende Dehydrasen zerstört und damit ihre etwaige Mitreaktion ausgeschaltet (SHELTON u. SCHNEIDER 1952). Durch biochemische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass durch Gefrieren die meisten Fermente zerstört werden, während die Succinodehydrase selbst sehr kälteresistent ist (vgl. Göbel u. Puchtler 1955). "Bei Untersuchungen am Gewebsblock ist dagegen die Mitwirkung anderer Dehydrasen wie Citricodehydrase, Malicodehydrase und Fumarsäuredehydrase denkbar" (GÖBEL u. PUCHTLER 1955).

3. Die Schnitte werden nicht fixiert, da die Succinodehydrase durch solche Prozeduren ihre Aktivität einbüsst (GÖBEL u. PUCHTLER 1955).

4. Die Konstanterhaltung des pH bei 7,6 ist erforderlich, da bei niedrigem pH die Mitbeteiligung reduzierender Gruppen, wie Sulfhydryl-, Enol-, Aldol- und Ketogruppen ausgeschaltet ist. (GÖBEL u. PUCHTLER).

5. Zur Bebrütung wird ausser dem Reduktionsindikator (Tetrazolpurpur) noch Succinat als spezifischer H₂-Donator zugegeben. Es läuft dann folgende chemische Reaktion ab:



6. Als positiver Ausfall gilt nach NEUMANN u. KOCH entweder eine diffuse Rotfärbung oder das Auftreten von blauschwarzen Formazankristallen. Das diffuse Rot kann grundsätzlich zw. ierlei bedeuten: einmal Monoformazan an Stellen mit niederer Fermentaktivität durch unvollständige Reduktion oder in Lipoid gelöstes Di-formazan bei grossem Lipoidgehalt der untersuchten Gewebsart; dabei fällt das gebildete Formazan erst nach vollständiger Sättigung des Zellfettes mit Farbstoff kristallin aus. Ferner steht der erzielte Farbton in Abhängigkeit von der Bebrütungsdauer.

7. Das aus Tetrazolpurpur entstandene Formazan besitzt nach NEUMANN u. KOCH eine viel geringere Diffusionsneigung als die übrigen Formazane; diese soll erst nach Tagen einsetzen.

2. Tierversuche. In sämtlichen angeführten Fällen wurden zwischen zehn und zwölf Schnitte beider Nebennieren eines Tieres hergestellt; dabei streuten weder die Schnitte des gleichen Organs untereinander, noch trat eine Differenz zwischen den Schnitten beider Organe auf. Bei den kleinen Tieren (Mäuse und Ratten) konnten wir nur jeweils fünf bis acht Schnitte vergleichen. Kontrollversuche ohne Succinatzusatz im Medium an Nebennierenschnitten von Ratten zeigten keine histochemische Reaktion.

Kaninchen: Untersucht wurden die Nebennieren von 3-5-Wochen alten Kaninchen, die mit 2 ml Evipan-Na intraperitoneal getötet und sofort sezziert wurden. Nach vierstündiger Bebrütung zeigte sich bei zwei Tieren eine hellrote Färbung der Glomerulosa, in der mittleren und inneren Fasciculata fanden sich blässlila Tropfen, in der Reticularis kleinere und schwächer gefärbte Tropfen ohne Granula. Das Mark und die Kapsel blieben gelb.

Parallel verlaufende Versuche an Nierenschnitten führten zur intensiven histochemischen Reaktion.

In zwei weiteren Versuchen erschien die Kapsel leicht rötlich, die Glomerulosa ziegelrot. In der äusseren Fasciculata traten grosse dunkellila Tropfen auf, in der mittleren und inneren fanden sich viele feine Kristallnadeln blauschwarzen Formazans. Die Reticularis zeigte eine ziegelrote Färbung mit reichlich groben Granula; das Mark erschien gelb.

Meerschweinchen: Es wurden Tiere verschiedenen Alters in der oben angegebenen Weise getötet und sofort Gefrierschnitte der NN für 3-4h in das Incubationsmedium gegeben. In allen Versuchen gaben Leber- und Nierenschnitte eindeutig positiven Ausfall.

In drei Fällen blieben die Kapsel, Glomerulosa und das Mark ungefärbt, jedoch zeigten sich in der Fasciculata vereinzelte Flecken diffuser Rotfärbung, die Reticularis erschien etwas intensiver.

Bei drei weiteren Versuchen waren die Kapsel und das Mark ungefärbt, jedoch zeigten sich bei hellroter Verfärbung der Glomerulosa in der Fasciculata dunkellila Tropfen mit

vielen groben Granula, die Reticularis erschien ziegelrot mit zahlreichen groben Granula. Ganz vereinzelt traten auch Granula in der Glomerulosa auf.

Mäuse: Es wurden weisse Mäuse verschiedenen Alters in der oben angegebenen Weise getötet und die NN-Schnitte 3-4h bebrütet.

In fünf Fällen blieben Kapsel, Glomerulosa und Mark ungefärbt, die Fascikulata zeigte eine leichte Rötung mit vereinzelt blasslila Tropfen. In vier Fällen erschienen vereinzelte Granula in Reticulariszellen.

Ratten: Bebrütungszeit zwischen 4 und 5 Stunden.

In drei Fällen trat überhaupt keine Färbung auf. Anhaftendes Fettgewebe an der NN-Kapsel erschien nicht positiv. In einem Fall war die Glomerulosa und Reticularis leicht diffus gerötet und die Fascikulata ebenfalls diffus rot gefärbt. In vier Versuchen kam es zu eindeutig positivem Ergebnis mit Ausfall von teils groben Granula, teils feinen Kristallnadeln. Dabei fanden sich diese Farbniederschläge praktisch nur in der Reticularis und in reticularisnahen Fascikulatazellen, während sich in der ausseren Fascikulata fast nur lila Tropfen vorfanden. Auch in diesen Schnitten trat eine massive Reaktion im umgebenden Fettgewebe auf.

Katzen: Bebrütungszeit 3 Stunden. Es wurden zwischen 2 und 4 Wochen alte Katzen untersucht.

Bei allen vier Tieren konnten wir bei stärkster Fermentreaktion der Fettzellen in der Umgebung ausser einer ganz leichten diffusen Rotfärbung in einem Fall keinerlei Reaktion im NN-Gewebe erzielen.

Hund: Ein etwa vier Jahre altes männliches Tier wurde mit Äther getötet und beide NN binnen einer halben Stunde nach der Sektion eingefroren. Bebrütungsdauer 3 1/2 h.

Die Kapsel und Glomerulosa erschienen ungefärbt, in der Fascikulata traten in den reticularisnahen Zonen lila Tropfen auf, in der Reticularis kam es zur intensiven Anfärbung der Lipotide und zum vereinzelt Ausfall von kristallinem Formazan. Das Mark war wie in allen durchgeführten Versuchen leer.

3. Menschliche Nebenniere.

Fall 1: 4500 g schwere und 55 cm lange Totgeburt. Sektion 3h p.m. Todesursache: zentrales Atemversagen bei grossem Tentoriumriss mit Blutung bei reifer Totgeburt. NN 13,1 g äusserlich unauffällig.

Keine histochemische Reaktion an Gefrierschnitten.

Untersuchungen am Gewebsblock zeigen intensive Blaufärbung, die bereits nach 15' einsetzt. Auf den nachträglich angefertigten Gefrierschnitten zeigen sich in den Zellen

der Aussenzone massive grobe Granula, die Innenzone ist nur in den äusseren Anteilen gefärbt, nach innen nimmt die Intensität rasch ab. In einzelnen marknahen Abschnitten finden sich in Gefässnähe Formazannieder-
schläge.

Fall2: 24h alte, 755 g schwere und 35 cm lange Frühgeburt. Sektion 30' p.m. Todesursache: Vena terminalis Blutung bei lebensschwacher Frühgeburt. NN an typischer Stelle, von gehöriger Form und Grösse. Keine Knotenbildung oder Blutungen.

Histochemische Reaktion: wie in Fall 1.

Fall3: 14 Tage altes, 2500 g schweres und 48 cm langes Kind mit congenitalem Vitium cordis. Todesursache: Herzver-
sagen. Sektion: 2 h p.m.

Histochemische Reaktion: wie in Fall 1.

Fall4: 8 Stunden alte, 1573 g schwere und 42 cm lange Frühgeburt. Sektion 1 h 40' p.m. Todesursache: vereinzelte sog. hyaline Membranen und ausgedehnte Atelektasen der Lunge bei Frühgeburt.

Histochemische Reaktion: vereinzelte rundliche Granula in der Innenzone, Schnitt makroskopisch leicht gerötet.

Fall5: 24 Stunden alter, 4020 g schwerer und 58 cm langer männlicher Säugling. Sektion 1 h 50' p.m. Grundleiden: Hydrocephalus internus bei entzündlicher Aquaduktsteno-
se. Todesursache: Subarachnoidalblutung an der Hirnbasis.

Histochemische Reaktion: wie in Fall 1.

Anschliessend untersuchten wir die Schnitte auf Doppelbrechung und Sudanophilie und fanden folgendes Verhältnis zur histochemischen Reaktion:

Tierart	Succ.Deh.Reaktion			Doppelbrechung		
	Glom.	Fascik.	Retic.	Glom.	Fascik.	Retic
Kaninchen						
1	(+)	-	-	-	++	(+)
2	(+)	-	-	-	++	(+)
3	(+)	++	+++	++	(+)	-
4	(+)	++	+++	++	(+)	-
Meerschweinchen						
1	-	-	(+)	-	+	-
2	-	-	(+)	-	+	-
3	-	-	(+)	-	+	-
4	+	+	++	-	(+)	-
5	(+)	++	++	-	(+)	-

Tierart	Succ.Deh.Reaktion			Doppelbrechung u. Sudanophilie			
	Glom.	Fascik.	Retic.	Glom.	Fascik.	Ret.	
Meerschweinchen	6	+	++	++	-	+	-
Maus	1	-	(+)	(+)	-	+	-
	2	-	-	-	+	++	+
	3	-	(+)	(+)	-	-	-
	4	-	(+)	(+)	+	+	-
	5	-	-	(+)	-	-	-
Ratte	1	(+)	+	++	-	+	(+)
	2	(+)	++	++	-	++	-
	3	-	-	-	+	++	-
	4	-	-	-	+	++	-
	5	+	+	++	+	+	-
	6	-	-	-	+	+	-
	7	-	-	-	+	+	-
	8	-	(+)	+	+	+	-
Katze	1	-	-	-	++	++	++
	2	-	-	-	++	++	++
	3	-	-	-	++	++	++
	4	-	-	-	++	++	+
Hund		-	(+)	+	++	+	-

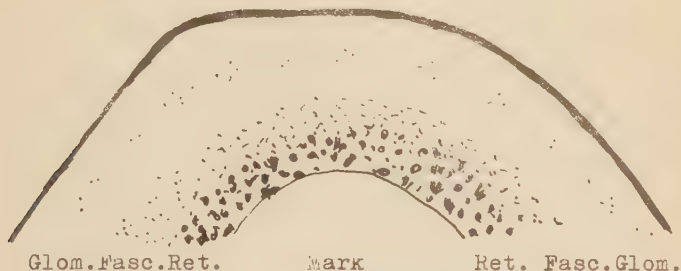
4. Eigenes Ergebnis.

Aus den angeführten Versuchen ergeben sich folgende Auffälligkeiten:

Die Succinodehydraseaktivität der Nebenniere erscheint bei unserem histochemischen Nachweisverfahren im Vergleich zu anderen Gewebsarten sehr labil und inkonstant. Jedenfalls trat in den aufgeführten Fällen mit reaktionsloser Nebenniere in Parallelschnitten von Leber und Niere, sowie in dem am Nebennierenschnitt haftenden Fettgewebe eine intensive Succinodehydrasereaktion mit Ausfall kristallinen Formazans auf.

Die positiven Nebennierenschnitte zeigen makroskopisch vielfach die gleiche Farbintensität wie Leber- und Nierengewebe; mikroskopisch sind jedoch Unterschiede derart festzustellen, dass sich in Leber und Niere reichlich granuläres Formazan niederschlägt, während in adrenalem Gewebe eine diffuse Rotfärbung überwiegt. Hierfür ist wohl der grössere Gehalt der Nebenniere an Lipoid verantwortlich, in welches das gebildete Formazan zunächst hineindiffundiert, um erst bei vollständiger Sättigung des Fetts kristallin auszufallen.

In allen positiven Präparaten zeigt sich kristallines Formazan nur in der Reticularis und in reticularisnahen Fasciculatazellen entweder in Form feiner Nadeln oder gröberer Granula.



Skizze des musterhaften Verhaltens der Succ. Deh. Reaktion am Meerschweinchen (Tier 5) auf Grund der eigenen Versuchsergebnisse. Die reticularisnahe Fasciculata zeigt zahlreiche feine, die Reticularis grobe Granula; wenig Formazan in der Glomerulosa; Mark negativ.

Das Mark ist praktisch immer "leer"; es erscheint im histologischen Bild stets nur leicht gelblich verfärbt.

Zwischen histochemischer Darstellbarkeit der Succinodehydraseaktivität und Doppelbrechung ist ein gewisses inverses

Verhalten ersichtlich, was bei Katze, Hund und Kaninchen am deutlichsten in Erscheinung tritt. Bei der Untersuchung im Polarisationsmikroskop war zu beobachten, dass auch die Formazanniederschläge selbst eine Doppelbrechung geben, die sich jedoch von der der Lipide durch ein rötliches Aufleuchten unterscheidet. Damit war uns die Möglichkeit einer strengen Differenzierung gegenüber den schlechten als "doppelbrechende Substanzen der Nebennierenrinde" bezeichneten Lipide gegeben.

Geirierschnitte menschlicher Neugeborenen-Nebennieren zeigen mit einer einzigen - im übrigen nicht eindeutigen - Ausnahme keinerlei spezifische Succinodehydraseaktivität. Gewebsblöcke verfärbten sich ausnahmslos bereits nach wenigen Minuten, auf den danach hergestellten Schnitten sind massive Kristallniederschläge blauschwarzen Formazans in der Aussenzonenzone erkennbar. Nach den bestehenden Anschauungen (GÖBEL u. PUCHTLER 1954) dürfte es sich hierbei um die Reaktion unspezifischer Dehydrasen handeln.

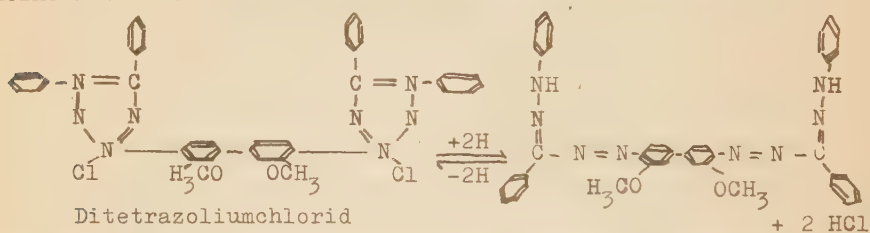
b) Ergebnisse anderer Autoren.

Unseren variierenden und inkonstanten Ergebnissen entsprechen in der eingesehenen Literatur die sehr differierenden Angaben über die histochemische Darstellbarkeit der adrenalen Succinodehydraseaktivität, sowohl bezüglich des qualitativen als quantitativen Ausfalls der jeweiligen histochemischen Reaktion. Unter Verwendung von TTC als Indikator konnten ZWEIFACH, BLACK u. SHORR an Nebennierengewebe von Mäusen, Ratten und Kaninchen positive Reaktionen sehen, wobei

das gebildete Formazan jedoch nicht wie in der Niere als Granula erscheinen, sondern aufgrund seiner kolloidlöslichkeit zu diffuser Anfärbung führte. Bei der Ratte färbten sich die drei Zonen einheitlich an, beim Hund, Meerschweinchen und Menschen war die Glomerulosa bevorzugt. Die Reticularis zeigte im allgemeinen intensivere Färbung als die innere Fasciculata, die Markzellen erschienen nicht signifikant gefärbt. Gen. Autoren zählen die Nebenniere zu den bernsteinsäureaktiven Geweben. Zu erwähnen bleibt, dass diese Versuche an Gewebsblock und ohne Succinatzusatz durchgeführt wurden, sodass es zur Mitreaktion unspezifischer Dehydrorasen kam. Bei den systematischen Untersuchungen von NEUMANN u. KOCH ergab sich, dass die Nebenniere unter den endokrinen Organen die grösste Succinodehydroaseaktivität besitzt, jedoch von Herz, Muskel, Belegzellen des Magens, Nephronanteilen und einigen anderen Gewebsarten erheblich übertroffen wird. Beim Meerschweinchen erwiesen sich die Zellen der inneren Glomerulosa und äusseren Fasciculata am aktivsten, innere Fasciculata, Reticularis und äussere Glomerulosa fielen etwas ab. Beim Hund blieb die Kapsel ungefärbt, die Glomerulosa zeigte mittelstarke Aktivität und war von der hochaktiven marknahen Fasciculata durch eine fermentschwächere Zone getrennt. Die Reticularis war deutlich positiv, namentlich in der äusseren Zone, das Mark negativ.

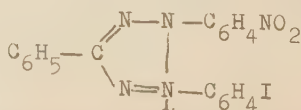
Demgegenüber konnten RUTENBERG, WOMAN u. SELIGMAN mit Dinitrotriazoliumchlorid (s. Formel) weder aerob noch anaerob eine eindeutige Succinodehydroasereaktion an Nebennierenschnitten

von Mäusen (50 Tiere), Ratten (30 Tiere), Hamster (4 Tiere) Kaninchen (5 Tiere) oder Hund (5 Tiere) erzielen. Gleichlaufende Versuche an Herz, Niere und Leber führten zu intensiver Formazanbildung. Lediglich beim Meerschweinchen zeigte sich eine nicht signifikante Farbspur im Nebennierenschnitt (vier Tiere). Selbst unter Zusatz von Aktivatoren der Bernsteinsäuredehydrase wie CaCl_2 , MgSO_4 , AlCl_3 oder Na-Bicarbonat trat keine histochemische Reaktion ein.



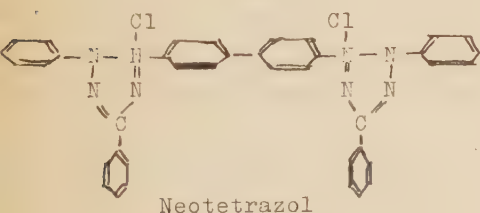
Mit dem gleichen Indikator erreichte PADYKULA an Gefrierschnitten von Rattennebnieren nach 2-stündiger anaerober Bebrütung und unter Zusatz von Ca^{++} und Al^{+++} als Aktivatoren eine auf die Rinde beschränkte positive Reaktion, wobei sich in einigen Schnitten alle drei Zonen in gleicher Intensität anfärbten, in anderen aber die Reticulariszellen ferment schwächer waren. Formazangranula fanden sich nur ganz vereinzelt um die rotbraunlichen Lipolotropfen der Rindenzellen. Kapsel und Mark verhielten sich in diesen Versuchen negativ.

PEARSON u. DEFENDI erhielten bei Verwendung von 2p-Jodphenyl-(p-nitrophenyl-5 phenyltetrazoliumchlorid) positive Reaktionen an Rattennebnieren, wobei das Maximum der Aktivität sich in die Glomerulosa lokalisierte und in den übrigen Zonen - vermutlich aufgrund des hohen Lipoidgehalts - lediglich eine orange Färbung auffiel.



2p-Jodphenyl-(p-nitrophenyl-5phenyl-1-

Zu einem anderen Ergebnis kamen JAPDETZKY u. GLICK, die an der Nebenniere der Ratte mit Neotetrazol (s. Formel) quantitative Untersuchungen anstellten, wobei sie das gebildete Formazan mit einer fettlösenden Alkohol-Tetraäthylen-Mischung extrahierten und danach den Gehalt der einzelnen Zonen kolorimetrisch bestimmten. Zur Erzielung einer höheren Spezirität wurde Versenat (Äthylendiamintetraessigsäure) als Enzymaktivator zugefügt. In Übereinstimmung mit den übrigen Autoren zeigte sich auch in diesen Versuchen das Mark praktisch inaktiv; im Gegensatz zu den oben erwähnten Angaben lag der absolute Höhepunkt der Aktivität jedoch in der Reticularis; in den übrigen Rindenschichten fand sich ein allmählicher Anstieg von Kapsel zu Glomerulosa, eine Betonung der Übergangszone von Glomerulosa zu Fasciculata, dann ein leichter Abfall in der Fasciculata selbst, dem in den reticularisnahen Zellen eine allmähliche Aktivitätszunahme folgte.



Laut Angabe der Herstellerfirma Bayer ist Neotetrazol mit dem von uns benutzten Tetrazolpurpur identisch.

VIII. Diskussion.

Als Grund dieser doch sehr auffallenden Differenzen in den Angaben über die histochemische Lokalisation der Succinodehydraseaktivität der Nebenniere möchten wir - wenigstens zum Teil - die unterschiedliche Methodik der einzelnen Autoren ansehen. Bei den Ergebnissen von ZWEIFACH, BLACK u. SHORR kamen nach den bestenenden Anschauungen (vgl. GÜBEL u.

PUCHTLER) andere Dehydrasen zur Mitreaktion. Nach GÖBEL u. PUCHTLER dürfte die Bevorzugung der Glomerulosa durch das bessere Eindringen des Mediums am Rande des Gewebsblocks zu erklären sein. Ein zweiter Unsicherheitsfaktor in der grob quantitativen Beurteilung der histochemischen Reaktion bietet sich im jeweiligen Lipoidgehalt der Nebenniere (vgl. GÖBEL u. PUCHTLER). In der im allgemeinen lipoidreichen Fascikulata wird das gebildete Formazan erst viel später granulär auftreten als in der im allgemeinen fettarmen Reticularis d.h. beide Zonen sind hinsichtlich des kristallinen Formazans nicht ohne weiteres einander vergleichbar; Granula in der lipoidreichen Fascikulata zeigen reichlich höhere Aktivität an als solche der Reticularis! Je nachdem, ob der einzelne Autor granulares Formazan als Mass seiner quantitativen Beurteilung zugrunde legt oder die Intensität der diffusen Rotfärbung, kann es natürlich zu differierenden Angaben über das Maximum der Fermentaktivität in dieser oder jener Zellschicht der Nebennierenrinde kommen.

IX. Succinodehydrase und Stress.

Unsere eigenen negativen Versuche sowie die konstant negativen Ergebnisse von RUTENBERG, WOLMAN u. SELIGMAN (1951 u. 1955) bei einwandfrei positiven Parallelschnitten von Herz, Leber und Niere, sowie anhaftendem Fettgewebe lassen jedoch noch eine weitere, von der angewandten Technik unabhängige Ursache vermuten. Auch die teilweise positiven Ergebnisse von PADYKULA mit einer Methodik, die der von RUTENBERG an-

gegebenen völlig gleicht, führen auf diese Spur. Wir sehen diesen Unruhefaktor in den ausserordentlich hohen funktionellen Schwankungen der Fermentaktivität des untersuchten Organs selbst. Gerade das Anpassungsvermögen der Nebennierenrinde in dieser Hinsicht ermöglicht es ja, die zahlreichen Reize von ausserem und innerem Milieu über hypophysäre Impulse in adäquater Weise zu beantworten und durch Ausschüttung von Hormonen den Organismus in die jeweils angemessene Reaktionslage zu versetzen. Sind diese Vorgänge der Alarmreaktion und des "Stress" auch sehr kompliziert und in ihrem Ablauf noch wenig durchschaubar, so ist doch anzunehmen, dass in ihrem Zusammenhang Veränderungen des oxydativen Stoffwechsels mit Phasen erhöhter und erniedrigter Aktivität des Succinodehydrasesystems stehen. Wie oben erwähnt, machten bereits ZWEIFACH, BLACK u. SHORR auf diesen Zusammenhang aufmerksam und sprachen die histochemische Darstellbarkeit der Succinodehydrase geradezu als Index für den jeweiligen Funktionszustand der Nebenniere an, ähnlich anderen Messungen der funktionellen Aktivität wie Lipoidverteilung, Cholesterin- und Vitamin C-Gehalt und ordneten sie diesen in ihrem Aussagewert gleich. Als Stressversuch an 6 Ratten galt in dieser Arbeit eine zweimalige Applikation von 20 µ ACTH tgl. Die Tiere wurden nach 36 h getötet und die Nebennieren histochemisch untersucht; dabei zeigte die fasciculata fast keine

TTC-Reduktion bei gleichzeitiger Verminderung des intracellulären Lipoids; in der Reticularis waren die Lipide und die TTC-Reaktion erhalten, in der Glomerulosa fand sich keine Abweichung vom Normalbefund. Wurde jedoch 40% ACTH in einem Zeitraum von 8-10 Tagen verabreicht, so fiel in allen drei Zonen die Lipid- und TTC-Reaktion deutlich positiv aus. Auffallend an diesen Versuchen ist die Parallelität im Nachweis für Lipide und u n s p e z i f i s c h e Dehydrasen, während wir in eigenen Versuchen ein mehr oder minder inverses Verhalten zwischen Formazan und Doppelbrechung fanden.

Zu diesem Problem nahmen weiter PARRY und CUMING 1952 Stellung, indem auch sie eine Beziehung zwischen Enzymaktivität und sekretorischer Tätigkeit forderten. In ihren Versuchen an Albinoratten wurde die Nebenniere 4h nach einer ACTH-Injektion von 5 mg untersucht; dabei war das spektrophotometrisch nachgewiesene Tetrazol pro 100 mg Organgewicht von 252 μ g auf 350 μ g angestiegen. SOURKES u. HENEAGE (1951) hatten nach wiederholten Injektionen von Cortisonacetat eine Atrophie der Nebenniere, Verlust der Nebennierenzellen an Lipoid und eine mit Hilfe der Warburgapparatur gemessene Verminderung der endogenen Atmung festgestellt und erklärten dies mit einer Einschränkung des ACTH-Auswurfs durch das Cortison, was wiederum eine verminderte Aktivität der oxydierenden Fermente zur Folge habe. Auch die bereits vorher angeführten Untersuchungen von NIELSON u. HARPER, die Ratten über einige Zeit ionisierter Luft aussetzten, sprechen in

diesem Sinne. Der biochemisch zu beobachtende signifikante Abfall der Succinodehydraseaktivität der Homogenate wurde von den Autoren als Stresseffekt aufgefasst und zum Vergleich Injektionen mit ACTH an den Tieren vorgenommen. Eine einmalige Dosis von 5 mg führte nach vier Stunden zum messbaren Anstieg der Succinooxydaseaktivität; nach wiederholten Injektionen über sechs Tage konnte eine signifikante Reduktion der Aktivität nachgewiesen werden.

In diesen Zusammenhang reihen sich auch die Untersuchungen von DESMARAIS, DUGAL u. GAGNON (1955), welche die Wirkung der Hypophysektomie, ACTH-Applikation und des endogenen ACTH auf Gewicht und Stoffwechselaktivität der Rattennebenniere systematischen verfolgten. Die Succinodehydraseaktivität wurde durch spektrophotometrische Messung des gebildeten Formazan bestimmt. Bei uniaudrenalektomierten Tieren wurde - durch Sekretion endogenen ACTH - eine Parallelität von kompensatorischer Hypertrophie und absoluter Succinodehydraseaktivität notiert, während die relative (= SDA pro mg Nebenniere) unverändert erschien. Bei hypophysektomierten Ratten trat zunächst eine Verminderung der absoluten SDA ein, der eine Gewichtsabnahme der Nebenniere folgte. Eine gleichzeitige Injektion von ACTH erzielte eine erneute Zunahme von Gewicht und Aktivität. KALANT hingegen kam zu dem Ergebnis, dass die ACTH-Applikation neben einer Steigerung des Nebennierengewichts eine Abnahme der relativen SDA bewirkt; der absolute Enzymgehalt ist jedoch grösser als in Kontrollen. Sicherlich ist es eine Frage der Dosierung des ACTH - oder

allgemein gesprochen des Ausmasses des Stresserflekts - und der Beobachtungszeit, in welchem Momentanzustand sich die histochemisch oder biochemisch fassbare Succinodehydraseaktivität der Nebenniere befindet. Und ferner wird die In- oder Reaktivierung der oxydierenden Fermente wiederum individuellen Schwankungen unterlegen sein. In unseren eigenen Versuchen sind vor allem die stets negativen Befunde an Nebennieren junger Katzen auffallend, ist ja bekanntlich die Katze gerade ein in Bezug auf Stressfaktoren ausserordentlich sensibles Tier.

Um den Ausfall der Succinodehydrasereaktion nun umgekehrt als Masstab zur Beurteilung der sekretorischen Tätigkeit der Nebenniere verwerten zu können, müssten nach unserer Ansicht weitere Untersuchungen angestellt werden, etwa derart, dass nach einem Stressereignis die histochemische Reaktion über einen grösseren Zeitraum kontinuierlich in möglichst geringen Zeitabständen verfolgt würde; auch dann hätte man allerdings noch Unsicherheitsfaktoren, wie die individuellen Schwankungen der Stressreaktion bei den einzelnen Tieren in Betracht zu ziehen. Man erkennt die Schwierigkeit, aus der histochemischen Momentaufnahme berechnigte Schlüsse auf das dynamische Geschehen der Steroidogenese ziehen zu können.

Wie bei den übrigen Methoden zur Bestimmung der Aktivität der Nebennierenrinde im histologischen Präparat, der Untersuchung

der Sudanophilie, der Doppelbrechung, des Cholesterin- und Vitamin C-Gehalts, der Plasmalreaktion, der Phenylhydrazinreaktion und den morpnokinetischen Studien (BACHMANN 1952) und wie bei den erwähnten biochemischen Ergebnissen ist der Aussagewert einer einzelnen Reaktion für sich allein sehr gering und vieldeutig, kann jedoch in Zusammenhang mit anderen erprobten Methoden an Bedeutung gewinnen. So sollte, wie dies erneut von BACHMANN vorgeschlagen wurde, zur Prüfung des Funktionszustandes der Nebennierenrinde eine "Battery" von Methoden verwendet und gegeneinander abgewogen werden.

Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen sind wir uns des hypothetischen Charakters unserer Aussage bewusst, wenn wir unsere eigenen Ergebnisse etwa so deuten, dass im akuten Stress die vorhandenen Lipide ins Blut abgegeben werden und daher aus dem histologischen Bild verschwinden, während gleichzeitig durch ACTH die oxydierenden Fermente und unter ihnen die Succinodehydrase zu einer vermehrten Tätigkeit angeregt werden. Ist dieser Stress nur kurzfristig, so bleibt ein Teil der neu im Überschuss gebildeten Steroide danach in den Zellen liegen, die Succinodehydraseaktivität sinkt auf normale oder unternormale Werte im Sinne einer Erholungsphase und ist damit vielleicht für kurze Zeit histochemisch nicht fassbar. Eine negative histochemische Reaktion könnte allerdings auch eine Erschöpfungsphase der Fermente bei lange andauerndem Stress ankündigen; dabei wäre anzunehmen, dass der Nachweis der Doppelbrechung im histologischen Pra-

parat auch negativ ausfielen, da die Lipide laudend an die Peripherie abgegeben werden.

Auffallend in diesen Versuchen ist jedenfalls, dass in den eindeutig positiven Präparaten fast nie doppelbrechende Substanzen - mit Ausnahme der im polarisierten Licht rot aufleuchtenden doppelbrechenden Formazankristalle selbst - in grösserem Ausmass angetroffen werden.

Bei den von uns erstmals unternommenen, fast ausnahmslos negativen Untersuchungen an menschlicher Neugeborenennebenniere können wir nicht entscheiden, ob das Ferment wirklich nur in histochemisch nicht fassbarer Konzentration vorhanden ist oder ob die konsumierenden Erkrankungen zu einem Dauerstress geführt und damit dasselbe inaktiviert haben. Die Anhäufung der unspezifischen Dehydrasen in den inneren Schichten der Aussenzone bei der Gewebsblockreaktion bleibt bemerkenswert. Ob sie mit der durch die Geburt hervorgerufenen Alarmreaktion der Aussenzone in Zusammenhang steht (DHOM u. Mitarb. 1959), bleibt zunächst noch dahin gestellt.

X. Zusammenfassung.

In einem einleitenden Teil werden die derzeitigen Anschauungen über Steroidogenese und die daran beteiligten Ferment-systeme kurz erörtert. Danach wird die allgemeine Zellfunktion der Succinodehydrase kurz umrissen.

Aus den physiologisch-chemischen Studien zeichnet sich noch kein ganz klares Bild vom Angriffspunkt der Bernsteinsäuredehydrase beim Aufbau des Steroidmoleküls ab; es wird jedoch von der Mehrzahl der Autoren angenommen, dass durch ihre AK-

tivitat dauernd Dicarbonsauren, nämlich Fumarat und Succinat als H_2 -Acceptoren für die Oxydationen an C_{17} , C_{21} und C_{11} im Steranring bereitgestellt werden.

Die Resultate der biochemischen Nachweisverfahren der Succinodehydrodrase im Adrenalgewebe divergieren zwar etwas hinsichtlich der absoluten Höhe der Fermentkonzentration, doch sind sie darin eindeutig, dass die Nebennierenrinde unter allen endokrinen Organen die grösste Aktivität besitzt. Ferner lassen sie gleichzeitig die Abhängigkeit des Fermentgehalts von verschiedenen Faktoren, wie Geschlecht, Tierart, Alter, hormonale Momentansituation sowie Umwelteinflüsse erkennen.

Eigene histochemische Untersuchungen wurden an Nebennierengewebe verschiedener Tierarten, wie Mäuse, Ratten, Meerschweinchen, Katzen, Kaninchen und am Hund vorgenommen. Zum ersten Mal wurde die Reaktion auch an Nebennierengewebe menschlicher Neugeborenen angestellt. Dabei ergab sich in Übereinstimmung mit den Versuchen anderer Autoren eine auffällige Labilität der Befunde. Alle Angaben gleichen sich darin, dass - trotz Verwendung verschiedener Tetrazole - bei gleicher intensiver Reaktion an Parallelschnitten von Herz, Niere und Leber Nebennierenschnitte erstaunlich oft negativ oder nur schwach positiv reagieren. Hinsichtlich der Lokalisation der maximalen Aktivität divergieren die Angaben jedoch, von einigen Autoren wird die Glomerulosa als Hauptdepot genannt; unsere Befunde stimmen mit den quantitativen von JARDETZKÍ u. GLICK überein, die den Übergang von Fasciculata zu Reticula-

Tabellarische Übersicht über die bisherigen
histochemischen Nachweise der S.D.Aktivität der NNR ver-
schiedener Tierarten u. des Menschen mit Angabe der Auto-
ren und des verwendeten Indikators.

Autor (Indikator)	Tierarten								
	Maus			Ratte			Meer- schweinchen		
	Glom.	Fasc.	Ret.	Glom.	Fasc.	Ret.	Glom.	Fasc.	Ret.
1. Zweifach, Black, Shorr (TTC)				+	+	+	++	(+)	+
2. Neumann, Koch (Tetrazolpurpur)							++	+	+
3. Rutenberg, Wolman, Seligman (Ditetrazolchlorid)	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)
4. Padykula (Ditetrazolchlorid)				+	+	+			
				+	und	+			
				+	+	(+)			
5. Pearson, Defendi (Jodophenyl-nitro- phenyl-5-phenyl- tetrazolchlorid)				+	(+)	(+)			
6. Jardetzky, Glick (Neotetrazol)				+	(+)	++			
7. Eigene Versuche (Tetrazolpurpur)	-	(+)	(+)	-	-	-	(+)	-	-
				(+)	bis ++	++	+	bis ++	++

Zeichenerklärung:

- = negativ
(+) = schwach positiv,
nicht signifikant
+ = signifikant positiv
++ = stark positiv

Tierarten									M e n s c h								
Kaninchen			Hamster			Katze			Hund			Erwachs.			Neugeb.		
Glom.	Fasc.	Ret.	Glom.	Fas.	Ret.	Glom.	Fas.	Ret.	Glom.	Fas.	Ret.	Glom.	Fas.	Ret.	AZ	I Z	
++	(+)	+							++	(+)	+	++	(+)	+			
									+	++	++						
			-	-	-	-	-	-	-	-	-						

(+) - -
 bis
(+) +++ +++

- - - - (+) + - - - - - bis
- (+)

Blockreaktion :
+++ +

ris als am aktivsten angeben. In allen Versuchen zeigt das Mark keine Reaktion.

Ob für die konstant negativen Befunde an den Nebennieren menschlicher Neugeborenen ein mit Inaktivierung der oxydativen Fermente einhergehender Dauerstress durch die vorausgegangenen konsumierenden Erkrankungen die Ursache ist, bleibt noch unklar.

Zwischen Succinodehydroasereaktion und Doppelbrechung war ein gewisses inverses Verhalten ersichtlich; wohl zeigen auch die Formazankristalle selbst im polarisierten Licht eine Doppelbrechung, doch unterscheidet sich diese von der der Lipide durch ein rötliches Aufleuchten (vgl. FLEISCHHAUER 1958).

Als mögliche Ursache für die inkonstanten Ergebnisse im histochemischen Nachweis der Bernsteinsauredehydrase wird die funktionsabhängige In- bzw. Reaktivierung des Ferments in Phasen verminderter oder gesteigerter endogener Sekretion angenommen.

Herrn Privatdozent Dr. med. G. D h o m danke ich
für die freundliche Überlassung des Themas.

Für seine wertvollen Hinweise und grosszügige Unterstützung bei der Ausführung der Arbeit bin ich ihm
besonders verpflichtet.

Herrn Professor Dr. F. T u r b a danke ich für
die Übernahme des Correferates.

Literaturverzeichnis.

1. Bachmann R. Verhandlg. dtsh. pathol. Ges. 1952 "Normale Anatomie der Nebennieren". S.68
2. Basford R.E., M.D. Tisdale und Green D.E. Biochem. Acta 24,290,1957
3. Bradley H.C. und Belfer S. Journal biol. Chem. 124,531,1938 "Autolysis of adrenal gland tissue"
4. Brownie A.C. und Grant I.K. Biochem. Journal 57,255,1954
5. " " " 62,29,1956
6. Desmarais A., Dugal L.D. und Gagnon P.M. Revue Canadienne de Biologie 14, 109,1955
7. Dhom G. und Mitarb.
8. Dorfman R.I. und Ungar F. Metabolism of Steroid Hormones, Mineapolis 1953
9. Elftman H. Endocrinology 41,85,1947
10. Felix K., Decker M. und Roka L. Z. physiol. Chem. 294,79,1953
- 10a. Fleischhauer K. Ztschr. Zellforschung u. mikrosk. Anatomie, Histochemie 1,119,1958
11. Glick D. und Glaubach S. Journal gen. Physiol. 25,197,1941 "The occurrence and distribution of Atropinesterase and the specificity of Tropinesterase"
12. Göbel A. und Puchtler H. Virchow Archiv 326,312,1955 "Untersuchungen zur Methodik der Darstellung der S.D. im histologischen Schnitt".
13. Hayano M., Dorfman R.I. und Yamada Y. Journal biol. Chem. 193,175,1951
14. Hayano M., Lindberg M.I., Arch. Biochem. 59,529,1955 Dorfman R.I., Hancock I.E. und W.E.v. Doering
15. Hayano M., Dorfman R.I. Journal biol. Chem. 201,175,1953
16. Hayano M., Wiener M., Lindberg M. Fed. Proc. 12,216,1953
17. Hayano M., Dorfman R.I. Journal biol. Chem. 211,227,1954
18. Hayano M. Fed. Proc. 13,226,1954
19. Hayano M. u. Dorfman R.I. Arch. Biochem. 36,237,1952
20. Hechter O. Adrenal Cortex Transactions of the 3rd Conference 1951,115 "The biogenesis of adrenal cortex steroids".

21. Hechter O., Zaffaroni A., Jacobsen , Levy, Jeanloz, Schenker V. und Pincus G. Recent Progr. Horm. Res. 6, 215 1951
22. Hechter O., Solomon M.M. Zaffaroni A., Pincus G. Arch. Biochem. 46, 201, 1953
23. Hechter O. und Pincus G. Physiol. Reviews 34, 459, 1954
24. Hench P.S., Kendall E.C., Slocumb C.H., Polley H.F. Proc. of the Staff Meetings of the Mayo Clinic 24, 181, 1949
25. Hofmann H., Kraushaar-Baldauf Verhdlg. dtsch. path. Ges. 1952 E., Staudinger H. S. 158
"Die Bedeutung der Ascorbinsäure für die Biosynthese der Corticosteroide"
26. Huscak S. Bioch. Ztschr. 312, 330, 1942
27. Jardetzky Ch.D. und Glick D. Journ. biol. Chem. 218, 283, 1955
28. Kahnt F.W., Wettstein A. Helv. Chim. Acta 34, 1790, 1951
29. Kalant O.J., Sellers E.A. Endocrin. 55, 777, 1954
30. Kalant O.J., Sellers E.A. " 61, 264, 1957
31. Kalant O.J. " 62, 237, 1958
32. Langenmann H. Helv. chim Acta 25, 464, 1942
"Cholinesterase in menschlichen Organen mit innerer Sekretion"
33. Lanman J., Moshel L. Endocrin. April 1957
34. Meyer A.S., Jeanloz H.W., Pincus G. Journ. biol. Chem. 203, 463, 1953
35. Nielson Ch. B., Harper H.A. Proc. Soc. exper. Biol. Med. 86, 753, 1954
"Effect of air ions on S.O. activity of the rat adrenal"
36. Neumann K.H., Koch G. Z. physiol. Chem. 295, 35, 1953
37. Padykula H.A. Am. Journ. Anat. 91, 107, 1952
38. Parry W.F., Cuming G.R. Endocrin. 50, 385, 1952
39. Pearson B., Defendi V. Journ. Histochem. Cytochem. 2, S.248, 1954
40. Plager I.E., Samuels L.T. Fed. Proc. 12, 357, 1953
41. " " Arch. Biochem. 42, 477, 1953
42. " " Journ. biol. Chem. 210, 27, 1954

43. Rapoport S., Nieradt Ch. Z. physiol. Chem. 302,179,
1955
44. " " Biochem. Acta 17,583,1955
45. Rutenberg A.M., Wolman M. J. Histochem. Cytochem. 1,
Seligman A.M. S. 66,1953
46. Samuels L.T. Ciba Found. Coll. 7,176,1953
47. Schmidt K.H., StaudingerH. Biochem. Ztschr.325,148,1954
48. Scent Györgi vgl. Lehnartz, Lehrb. phys.
Chemie S.299,1949
49. Scoz G., Mariani B. Enzym. 7,88,1939
50. Seligman A.M., RatenbergA. Science, Lancaster, Pa 113,
S.317,1951
51. Mc Shan, ErwayW.MeyerR.K. Arch.Biochem. 9,69,1946
52. " ,MeyerR.K.,ErwayW.F. " 15,99,1947
53. Shelton E.,Schneider W.C. Anat, Rec. 112,61,1952
54. Shepherd A.,Kalnitzky G. Journ.biol.Chem. 192,1,1951
55. Singer T.P.,Kearney E.B. " 223,599,1956
Bernath P.
56. Singer T.P.,Kearney B.B., Arch. Biochem.60.255,1955
Massey V.
57. Sourkes T.L.,Heneage P. Endocrin.49,601,1951
58. Srere P.A.,Chaikoff I.C, Journ.biol.Chem.176,829,1948
Dauben W.G.
59. Sweat M.L. Am.Chem.Soc. 73,4056,1951
60. Thunberg vgl. Lehnartz, Lehrb. phys.
Chem. S.287,1949
61. Wagenknecht C., RapoportS. Ztschr.phys.Chem.308,127,1956
62. Zaffaroni A., Hechter O., Am. Soc.73,1390,1951
Pincus G.
63. Zweifach B.W., Black M.M., Proc. Soc. exper. Biol.
Shorr E. Med. 76,446,1951

LEBENS LAUF .

Am 13. November 1931 wurde ich in Tauberbischofsheim / Nordbaden als Tochter des Diplomlandwirts Wilhelm Gulden und seiner Ehefrau Emilie geb. Oschmann geboren.

Mit dem 6. Lebensjahr besuchte ich die Volksschule in Tauberbischofsheim und trat 1942 in das dortige Realgymnasium ein. An dieser Schule bestand ich nach neunjähriger Schulzeit im Sommer 1951 das Abitur.

Im Wintersemester 1951 immatrikulierte ich mich als Studentin der Medizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, wo ich mein Physikum nach fünf Semestern im März 54 bestand. Nach dem ersten klinischen Semester in Würzburg immatrikulierte ich für zwei weitere Fachsemester an der Albert-Ludwig-Universität Freiburg /Br. Für die letzten drei Semester meines Studiums war ich wieder an der Universität Würzburg eingeschrieben. Mein Staatsexamen legte ich im September 1957 ab.

Anschliessend war ich drei Monate mit der Fertigstellung der experimentellen Arbeiten für die Promotion beschäftigt.

Von Januar bis Juni 1958 arbeitete ich als Medizinalassistentin an der Neurologischen Universitätsklinik in Würzburg. Seit Juli dieses Jahres bin ich zwecks meiner chirurgischen Ausbildung am Kreis Krankenhaus Bad Mergentheim beschäftigt.

Ich versichere ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und ausser der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, dass ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Maria-Elisabeth Gulden

